DOI:10.11931/guihaia.gxzw202303037

海三棱藨草及其近缘种的 DNA 条形码研究

张仕兰[1]，王屿岑[1]，刘文亮[1,2*]
（1. 华东师范大学 生态与环境科学学院，上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室，上海 200241；2. 崇明生态研究院，上海 200062）

摘 要：海三棱藨草[× *Bolboschoenoplectus mariqueter* (Tang & F. T. Wang) Tatanov]的分类学地位至今尚无定论。为明确海三棱藨草的分类学地位并探讨其与近缘种的关系，该研究分别利用 1 个核基因（ITS）和 5 个叶绿体基因（*mat*K、*ndh*F、*rbc*L、*trn*L 和 *trn*L-*trn*F）的 DNA 条形码序列对海三棱藨草及其近缘种的 4 种 21 批样品进行扩增和测序，然后通过采用相似性搜索算法对单一序列和序列组合的物种鉴定效率进行评价，最后基于贝叶斯推断方法构建系统发育树进行鉴定分析。结果表明：（1）ITS + *mat*K 序列组合的物种鉴定成功率最高，为 71.4%，可实现海三棱藨草及其近缘种的种间区分、鉴定；（2）基于 ITS + *mat*K 序列组合构建海三棱藨草及其近缘种的系统发育树，结果表明同一物种的样品聚集度较好，海三棱藨草与三棱草属[*Bolboschoenus* (Asch.) Palla]的物种聚为一支，明显与水葱属[*Schoenoplectus* (Rchb.) Palla]物种分开，且海三棱藨草与海滨三棱草[*Bolboschoenus maritimus* （Linnaeus） Palla]形成单系。综上所述，ITS + *mat*K 序列组合可作为海三棱藨草及其近缘种物种鉴定的最佳条形码序列，研究结果不支持海三棱藨草为天然杂交种的观点，而应将其归入到三棱草属中，海三棱藨草应为海滨三棱草的异名。该研究为海三棱藨草及其近缘种的分类学研究提供了分子依据。

关键词：海三棱藨草，近缘种，DNA 条形码，物种鉴定，亲缘关系
中图分类号：Q949.71 + 4.3

Study on × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and related species based on DNA barcoding

ZHANG Shilan[1], WANG Yucen[1], LIU Wenliang[1,2]*
(1. *Shanghai Key Lab for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration*, *School of Ecological and Environmental Sciences*, *East China Normal University*, Shanghai 200241, China; 2. *Institute of Eco-Chongming*, Shanghai 200062, China)

Abstract: The taxonomic status of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* (Tang & F.T.Wang) Tatanov is still up for debate. To clarify this status and explore its genetic relationship with closely related species, the candidate DNA barcode sequences of one nuclear gene (ITS) and five chloroplast genes (*mat*K, *ndh*F, *rbc*L, *trn*L and *trn*L-*trn*F) were used for PCR amplification and sequencing of 21 individuals from four species, including × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and its related species. The Basic Local Alignment Search Tool was then applied to evaluate the identification efficiency of the screened barcode sequences and sequence combinations. Finally,

收稿日期：2023-07-13
基金项目：
第一作者：
*通信作者：

species identification analyses were performed by constructing a phylogenetic tree using the Bayesian inference method. The results demonstrated that: (1) The ITS + *mat*K combination showed the highest species-resolving degree of 71.4%, which could achieve interspecific differentiation and identification of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and its closely related species; (2) According to the phylogenetic tree based on ITS + *mat*K sequences, samples of the same species showed better aggregation and were mostly monophyletic, with × *Bolboschoenoplectus mariqueter* clustered together with all *Bolboschoenus* (Asch.) Palla individuals, rather than *Schoenoplectus* (Rchb.) Palla species. All × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and *Bolboschoenus maritimus* (A. Nelson) T. Koyama samples formed a monophyletic clade. In conclusion, ITS + *mat*K appears to be the best barcode sequence for interspecific identification of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and its related species. Furthermore, × *Bolboschoenoplectus mariqueter* could be a synonym of *Bolboschoenus maritimus* rather than a natural hybrid. This study could establish a theoretical foundation for the taxonomic research on × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and its closely related species.

Key words: × *Bolboschoenoplectus mariqueter*, related species, DNA barcoding, species identification, genetic relationship

海三棱藨草[× *Bolboschoenoplectus mariqueter* (Tang & F. T. Wang) Tatanov]属莎草科（Cyperaceae），主要分布在长江河口及杭州湾滩涂，曾被报道为我国特有的滩涂湿地先锋种(唐进和王发瓒，1965)，具有维持生物多样性、消减波浪、固滩护堤、促进泥沙沉降和为迁徙越冬的水鸟提供栖息地等多种生态功能(朱晶等，2007，；陈秀芝和孙瑛，2011)。

海三棱藨草的正名问题及其所在属的分类地位一直未能解决。海三棱藨草因其秆为三棱形，花序假侧生等性状与藨草（*Scirpus triqueter* L.）相似，而其穗大和小坚果表面网纹等性状又与扁秆藨草（*Scirpus planiculmis* Fr. Schmidt）相似，被以藨草和扁秆藨草的天然杂交种即 *Scirpus* × *mariqueter* Tang et F. T. Wang 发表(唐进和王发瓒，1965)；随着藨草属（*Scirpus* L.）系统学研究的不断深入，广义藨草属被划分为若干属，海三棱藨草的亲本藨草和扁秆藨草被划分到不同的属，即水葱属[*Schoenoplectus* (Rchb.) Palla]和三棱草属[*Bolboschoenus* (Asch.) Palla]，二者的中文名和学名变更为三棱水葱[*Schoenoplectus triqueter* (L.) Palla]和扁秆荆三棱[*Bolboschoenus planiculmis* (F. Schmidt) T. V. Egorova]；Tatanov (2007) 承认海三棱藨草为属间杂交种，并以此建立了新的杂交属 × *Bolboschoenoplectus* Tatanov，因此海三棱藨草的学名变更为[× *Bolboschoenoplectus mariqueter* (Tang & F. T. Wang) Tatanov](Dai et al., 2010)。Koyama (1980) 将 *Scirpus* × *mariqueter* 作为 *Bolboschoenus planiculmis* 的异名，认为海三棱藨草只是扁秆荆三棱的单穗变异类型。随着测序技术的不断发展，一些分子标记被开发应用于海三棱藨草及其近缘种的遗传结构和亲缘关系分析中。Yang 等 (2009; 2013)通过 AFLP 分子标记技术和种间杂交实验分析了海三棱藨草与其潜在亲本扁秆荆三棱和三棱水葱的亲缘关系，实验结果表明海三棱藨草非杂交起源，且与扁秆荆三棱的亲缘关系更近，但作者未明确界定二者是否为独立的物种。另外，前人还采用 AFLP 分子标记技术和微卫星标记技术揭示了扁秆荆三棱和海滨三棱草[*Bolboschoenus maritimus* (Linnaeus) Palla]遗传结构的相似性，并在二者分布的重叠区域发现了大量的杂交后代，但这些个体无法通过分类函数进行明确的物种界定(Zhou et al., 2009; Píšová et al., 2017)。研究表明，三棱草属植物果实的横切面形状和果皮的厚度是重要的种间鉴别特征(Hroudová et al., 2007; Píšová et al., 2017)。宋晨薇等(2019)通过观察比较海三棱藨草及其近缘种的果实形态和果皮微结构特征，发现海三棱藨草在果实形态和果皮厚度上与扁秆荆三棱明显差异而与海滨三棱草相似，因而推论其为海滨三棱草水滨亚种[*Bolboschoenus*

maritimus subsp. *paludosus* (A. Nelson) T. Koyama]的异名。综上，关于海三棱藨草的分类地位及其与近缘种的亲缘关系仍然需要进一步探究。

2003 年，Hebert 首次提出了 DNA 条形码技术，即利用一段公认的、标准的、易于扩增的且具有足够变异的短 DNA 片段来实现对物种的快速鉴定(Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b)。经过 20 年的发展，DNA 条形码技术已经成为了生命科学研究中发展最迅速的方向之一，在植物物种鉴定及分子系统学研究领域彰显出广阔的应用前景(Costion et al., 2011; Li et al., 2015; Hu et al., 2022)。目前 DNA 条形码技术已被广泛应用于莎草科植物的鉴定、系统发育关系和演化历史的研究中，并且取得了一定的成果(Yen & Olmstead, 2000; Starr et al., 2009; Clerc-Blain et al., 2010; Glon et al., 2017; Léveillé-Bourret et al., 2020)。但关于海三棱藨草及其近缘种基于基因片段的分子系统学研究相对滞后。准确的物种鉴定是生物多样性保护的基础和前提(Vane-Wright et al., 1991)。实现海三棱藨草的科学鉴定对三棱草属植物系统发育重建及分类学研究具有重大的理论意义和实际价值。

本研究通过选用 6 组候选序列（ITS、*mat*K、*ndh*F、*rbc*L、*trn*L 和 *trn*L-*trn*F）对海三棱藨草及其 3 个近缘种共 21 个样本进行 DNA 条形码研究，通过比较分析扩增序列的特征、种内种间变异率和鉴定成功率等指标，评估不同候选序列及其组合的物种分辨能力，拟筛选出适用于海三棱藨草及其近缘种鉴定的最佳 DNA 条形码序列，同时基于建树法进行系统发育分析，进一步探讨海三棱藨草与其近缘种之间的关系，以期为海三棱藨草的分类学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选取海三棱藨草[× *Bolboschoenoplectus mariqueter* (Tang & F. T. Wang) Tatanov]及其 3 个近缘种，包括扁秆荆三棱[*Bolboschoenus planiculmis* (F. Schmidt) T. V. Egorova]、海滨三棱草[*Bolboschoenus maritimus* (Linnaeus) Palla]和荆三棱[*Bolboschoenus yagara* (Ohwi) Y. C. Yang & M. Zhan]总共 21 份样本作为研究材料（表 1），本研究中海三棱藨草及其近缘种的形态特征及地理分布比较详见表 2、表 3。

表 1 标本信息

Table 1　Information of collected samples

物种 Species	采集地 Locality	凭证标本 Specimen Vouchers	采集人 Collector	采集日期 Date
海三棱藨草 × *Bolboschoenoplectus mariqueter*	上海崇明东滩 Chongming Dongtan	Xu20161017-1 Xu20161017-2 Xu20161017-3 Xu20161017-4 Xu20161017-5 Xu20161017-6 Xu20161017-7	徐晓 XU Xiao	20161017
扁秆荆三棱 *Bolboschoenus planiculmis*	上海辰山植物园 Shanghai Chen Shan Botanical Garden	Dll20180624-1 Dll20180624-2 Dll20180624-3 Dll20180624-4 Dll20180624-5 Dll20180624-6	邓玲丽 DENG Lingli	20180624

海滨三棱草 *B. maritimus*	新疆阿勒泰市乌伦古湖 Ulungu Lake, Altay City, Xinjiang	Scw20180918-1 Scw20180918-2 Scw20180918-3 Scw20180918-4 Scw20180918-5	宋晨薇 SONG Chenwei	20180918
荆三棱 *B. yagara*	新疆清河县塔克什肯镇 Takeshiken Town, Qinghe County, Xinjiang	Scw20180914-1 Scw20180914-2 Scw20180914-3	宋晨薇 SONG Chenwei	20180914

表 2 海三棱藨草及其近缘种的形态学特征比较

Table 2 Morphological feature comparison of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and related species

	扁秆荆三棱 *Bolboschoenus planiculmis*	海三棱藨草 × *Bolboschoenoplectus mariqueter*	海滨三棱草 *Bolboschoenus maritimus*	荆三棱 *Bolboschoenus yagara*	三棱水葱 *Schoenoplectus triqueter*
秆 Culm	秆单生，高 60～100 cm，锐三棱形；平滑 Culms solitary from a tuber, 60～100 cm tall, sharply 3-angled, smooth,	秆单生，高 20～90 cm，锐三棱形；平滑 Culms solitary from a tuber, 20～90 cm tall, sharply 3-angled, smooth	秆单生，高 25～40cm，锐三棱形；平滑 Culms solitary from a tuber, 25～40 cm tall, sharply 3-angled, smooth	秆单生，高 70～150 cm，锐三棱形；平滑； Culms solitary from a tuber, 70～150 cm tall, sharply 3-angled, smooth	秆散生，高 20～90 cm，钝三棱形；光滑；Culms solitary, erect, 20～90 cm tall, obtusely 3-angled, smooth
茎 Rhizome	匍匐根状茎长，具球状块茎 Rhizomes long creeping, terminated in a globose tuber	匍匐根状茎长，具球状块茎 Rhizomes long creeping, terminated by a small ovoid tuber	匍匐根状茎长，具球状块茎 Rhizomes long creeping, terminated by a small ovoid tuber	匍匐根状茎长，具球状块茎；Rhizomes long creeping, tuber globose to depressed obovoid	匍匐根状茎长，无球状块茎； Rhizomes long creeping, without tuber
叶 Leaf	4～6，叶基生和秆生，条形，叶片扁平，2～5 mm 宽，基部具有长叶鞘 4～6, Leaves basal, leaf blade linear, 2～5 mm wide, base with long leaf sheath;	1～2，常退化，2～3 mm宽 1～2, usually leafless, 2～3 mm wide;	1～2，常退化，2～6 mm宽 1～2, usually leafless, 2～6 mm wide	叶基生和秆生，5～10 mm 宽； Basal leaf and culm, 5～10 mm wide	1～2，常退化，1.5～2mm 宽； 1～2, usually leafless, 1.5～2 mm wide
苞片 Involucral bract	叶状苞片 2～3，长于花序 Involucral bracts 2～3, leaflike, often surpassing inflorescence0	苞片 2，一枚为秆的延伸，较小穗长很多，另一枚与小穗近等长 Involucral bracts 2, one is a continuation of culm, much longer than spikelet, the other bract is nearly as long as the spikelet	苞片 2，一为秆的延伸，较小穗长很多，另一枚稍长于小穗或与小穗等长 Involucral bracts 2, one is a continuation of culm, much longer than spikelet, the other slightly longer than or equal to the	苞片 3～4，通常长于花序； Involucral bracts 3 or 4, leaflike, usually longer than inflorescence	苞片 1，为秆的延长，较小穗长很多；Bract 1, elongated culm, longer than spikelets;

			spikelet		
花序 Inflorescence	长侧枝聚伞花序短缩成头状，顶生，偶有辐射枝 Inflorescences capitate or simple paniculate; rays 1 to few	花序假侧生，1～2.5 ㎝长 Inflorescence pseudolateral, 1 ～ 2.5 cm long	头状花序，很少具有辐射枝 Inflorescences capitate, rarely with short rays	长侧枝聚伞花序简单，具 3～8 个辐射枝，辐射枝最长达 7 ㎝，每个辐射枝具 1～3 个小穗 Inflorescence a simple anthela; rays 3 ～ 8, unequal, to 7 cm, each terminated by a single spikelet or a cluster of 3 spikelets	简单长侧枝聚伞花序假侧生，有 1～8 个辐射枝，辐射枝三棱形，，长可达 5 ㎝，每辐射枝顶端有 1～8 个簇生的小穗 Inflorescence a simple pseudolateral anthela, rays 1 ～ 8, to 5 cm long, bearing 1 ～ 8 spikelets or congested in a headlike cluster
小穗 (Dai et al., 2010; Liang et al., 2010) Spikelet	无柄小穗 1～6，卵形或矩圆卵形；鳞片矩圆形，6～8 ㎜长，有 1 条脉，顶端具撕裂状缺刻，有芒；下位刚毛 4～6，具倒刺，长为小坚果的 1/2～2/3，易脱落 Inflorescences of 1 ～ 6 sessile spikelets, ovoid to oblong-ovoid ; glumes oblong to elliptic, 6 ～ 8 mm, 1-veined costa projected beyond apex forming an awn; Perianth bristles 4 ～ 6, retrorsely scabrous 1/2–2/3 as long as nutlet, caducous	小穗宽卵圆形，无柄，通常 1 个，偶见 2～3 个；鳞片卵形， 6～8 ㎜长；中脉伸出顶端呈短尖；下位刚毛 4，长为小坚果的 1/2～2/3，具倒刺，易脱落 Spikelets broadly ovate, sessile, usually 1, occasionally 2～3; glumes ovate, 6～8 mm, 1-veined costa excurrent into an awn; perianth bristles 4, 1/2 ～ 2/3 as long as nutlet, retrorsely scabrous, caducous	小穗宽卵圆形，无柄，通常 1 个，偶见 2～3 个；鳞片卵形， 5～8 ㎜长，中脉伸出顶端呈短尖；下位刚毛 4～6，长为小坚果的 1/2，具倒刺，易脱落 1, rarely2 ～ 3 sessile spikelets, ovoid to narrowly ovoid; glumes oblong-ovate, 5 ～ 8 mm long, 1-veined costa excurrent into an awn; perianth bristles 6, ca. 1/2 as long as nutlet, retrorsely scabrous, caducous	小穗 1～3，长圆形，无柄；鳞片长圆形，长约 7 ㎜，背面具有一条中肋，顶端具芒；下位刚毛 6，几与小坚果等长，具倒刺 Sessile spikelets 1 ～ 3 oblong; glumes oblong, ca. 7 mm, 1-veined costa projected beyond apex forming a recurved scabrous awn; perianth bristles 6, as long as nutlet; retrorsely scabrous, persistent up to maturity	小穗 3～20，长圆形；鳞片长圆形、椭圆形或宽卵形，长 3～4 ㎜，背面具一条中肋，稍延伸出顶端呈短尖；下位刚毛 3 ～ 5 条，几等长或稍长于小坚果，具倒刺 3 ～ 20 spikelets , oblong; glumes oblong, elliptic, or ovate, 3 ～ 4 mm long, apex emarginate to rounded with a costa excurrent into a mucro; perianth bristles 3 ～ 5, a few length or slightly longer than small nuts, agnail
雄蕊 Stamen	雄蕊 3，花药线形 Stamens 3; anthers linear	雄蕊 3 Stamens 3	雄蕊 3， 花药线状椭圆形 Stamens 3; anthers linear-oblong	雄蕊 3，花药线形 Stamens 3, anthers linear	雄蕊 3，花药线形 Stamens 3, anthers linear;
雌蕊 Pistil	花柱细长，柱头 2； Style slender; stigmas 2	花柱细长，柱头 2 Style slender; stigmas 2;	花柱细长，柱头 2 或 3； Style slender; stigmas 2 or 3	花柱细长，柱头 3； Style slender; stigmas 3	花柱短，柱头 2； Style short, stigma 2

果实 Nutlet (Hroudová et al., 2005; 宋晨薇等，2019)	双凹状；表面纹饰网状；外果皮与中果皮近等厚 Biconcave; achene surface shows a well-visible polygonal network structure; exocarp approximately as thick as mesocarp	双凸状；表面纹饰网状；外果皮为中果皮厚度的 2 倍 Biconvex; achenes surface with well-visible polygonal network structure; exocarp mostly ca twice as thick as mesocarp	双凸状；表面纹饰网状；外果皮为中果皮厚度的 2 倍 Biconvex; achenes surface with well-visible polygonal network structure; exocarp mostly ca twice as thick as mesocarp	三棱状；表面纹饰网状；外果皮极薄，为中果皮厚度的 1/8 Triangular; surface ornamentation with a fine network; exocarp is very thin, exocarp thickness ca 1/8 of mesocarp thickness	平凸状；表面纹饰平滑型；外果皮极薄，为中果皮厚度的 1/8 Plano-convex; surface decoration smooth type; The outer pericarp is very thin, 1/8 of the thickness of the middle pericarp

表 3 海三棱藨草及其近缘种的生境及分布地

Table 3 Habitat and distribution area of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and related species

	扁秆荆三棱 *Bolboschoenus planiculmis*	海三棱藨草 × *Bolboschoenoplectus mariqueter*	海滨三棱草 *Bolboschoenus maritimus*	荆三棱 *Bolboschoenus yagara*	三棱水葱 *Schoenoplectus triqueter*
生境 Habitat	内陆淡水生境（河边、湖边） Freshwater habitats (river, lake), mostly inland;	沿海沼泽，内陆湖滨、河岸等; Coastal marshes, inland lakeside, riverbank;	沿海沼泽，内陆湖滨、河岸等; Coastal marshes, saline lakeside, riverbank;	湖、河浅水中; Lake, riverbanks, shallow ditches;	淡水或盐沼湿地; Freshwater habitats or brackish habitats;
分布地(梁士楚, 2022) Distribution area	中国（黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、山西、河北、北京、天津、河南、山东、江苏、安徽、上海、浙江、江西、湖北、广西、云南、重庆、陕西、宁夏、甘肃、青海、新疆、台湾）、日本、朝鲜 China (Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Inner Mongolia, Shanxi, Hebei, Beijing, Tianjin, Henan, Shandong, Jiangsu, Anhui, Shanghai, Zhejiang, Jiangxi, Hubei, Guangxi, Yunnan, Chongqing, Shaanxi, Ningxia, Gansu, Qinghai, Xinjiang, Taiwan), Japan, Korea	中国（内蒙古、河北、北京、山西、江苏、上海、浙江） China (Inner Mongolia, Hebei, Beijing, Shanxi, Jiangsu, Shanghai, Zhejiang)	中国（上海、新疆、台湾）、印度、日本、俄罗斯；非洲、西南亚、大西洋岛屿、欧洲、北美洲和南美洲、太平洋岛屿; China (Shanghai, Xinjiang, Taiwan), Afghanistan, India, Japan, Russia, Africa, South-West Asia, Atlantic Islands, Europe, North and South America, Pacific Islands;	中国（黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、山东、河南、新疆、安徽、江苏、浙江、湖南、湖北、贵州、云南）、朝鲜、日本; China (Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Inner Mongolia, Hebei, Shandong, Henan, Xinjiang, Anhui, Jiangsu, Zhejiang, Hunan, Hubei, Guizhou, Yunnan), Korea, Japan;	中国（北京、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、河北、山西、山东、河南、陕西、宁夏、甘肃、青海、新疆、安徽、江苏、浙江、湖南、湖北、四川、重庆、云南、西藏、福建、台湾、广东、广西）、俄罗斯、日本、朝鲜，中亚细亚、欧洲、美洲; China (Beijing, Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Inner Mongolia, Hebei, Shanxi, Shandong, Henan, Shaanxi, Ningxia, Gansu, Qinghai, Xinjiang, Anhui, Jiangsu, Zhejiang, Hunan, Hubei, Sichuan, Chongqing, Yunnan, Xizang, Fujian, Taiwan, Guangdong, Guangxi), Russia, Japan, Korea, Central Asia, Europe, America;

1.2 实验方法

1.2.1　植物基因组的提取、PCR 扩增及测序

采用植物基因组 DNA 试剂盒（Tiangen Biotech Co., LTD）提取植物的总 DNA。序列扩增用到的引物信息及 PCR 反应的扩增程序见表 4；PCR 扩增采用 100 μL 反应体系：灭菌后的 ddH_2O 69.5μL，TaqBuffer 10 μL，dNTP 8 μL，上、下游引物各 4 μL，DNA 模板 4 μL，EX Taq 酶 0.5 μL；扩增完成后用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，筛选出条带清晰的样品送到华大基因公司进行双向测序。

1.2.2　数据处理

利用 The DNASTAR LaserGene package （DNASTAR Inc., Madison, WI, USA）中的 SeqMan 软件对测序得到的双向峰图进行校对、拼接，去除两端峰图杂乱、质量较低的序列，采用 MEGE7.0 软件进行多序列比对，利用 DnaSP 6.0 统计各个 DNA 条形码序列的特征信息和变异位点信息；基于 K2P （Kimura 2-parameter model）双参数模型计算种内和种间的遗传距离，评价条形码在种内、种间的变异情况；利用相似性搜索算法（Basic Local Alignment Search Tool, BLAST 法）考察分析各条形码候选序列的鉴定成功率，通过将实验获得的全部序列作为查询序列输入到 GenBank 数据库中，利用 NCBI-BLAST 相似性比对工具进行批量数据分析。当返回的比对结果中最大的相似物种（Identity > 95%，且 *E* Value $< 1\times10^{-5}$）与该查询序列所属的物种一致，且不包含其他物种时则视该物种鉴定成功，反之则视为鉴定失败。对于联合片段物种鉴定效率的计算，在本研究中只要其中一个片段能够成功鉴定出该物种，则组合片段也能鉴定出该物种(Liu et al., 2015)，物种鉴定效率=鉴定成功物种个体数/总个体数。采用贝叶斯推断法构建系统发育树，进行遗传聚类分析。

表 4 PCR 扩增引物与扩增程序

Table 4 Polymerase chain reaction amplification primers and procedures

DNA 条形码 DNA barcoding	引物序列(5′-3′) Primers sequence (5′-3′)	扩增程序 Amplification program
ITS (White et al., 1990; Ward et al., 1998)	ITS4_F: TCCTCCGCTTATTGATATGC ITS5_R: GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	94 ℃ 2 min, 25 cycles (94 ℃ 30 sec, 42 ℃ 2 min, 72℃ 2 min), 72℃ 10 min
*mat*K (Gilmour et al., 2013)	*mat*K-1F: CGTCAACAACAATGCTTATATCC *mat*K-RL: GCTTTGCCTTGATATCGAAC *mat*K-2.5F: TCAATGCTGGRTCCAAGATA *mat*K-5R: TTTATGTTTACGAGCCAAAG	94 ℃ 2 min, 40 cycles (94 ℃ 30 sec, 47 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min), 72℃ 8 min
*ndh*F (Gilmour et al., 2013)	*ndh*F-A: TATGGTTACCTGATGCCATGGA *ndh*F-B: CCCCATAGAGATATTGAAT *ndh*F-C: TAACAGCATTTTATATGTTTCG *ndh*F-D1: CTATRTAACCRCGATTATATGACCAA	94 ℃ 2 min, 40 cycles (94 ℃ 30 sec, 47 ℃ 1 min, 72℃ 2 min), 72℃ 8 min
*rbc*L (Shinozaki & Sugiura, 1982; Olmstead et al., 1992)	1F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC 724R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC	94℃ 4min, 38 cycles (94℃ 30 sec, 45℃ 1min, 72℃ 1.5min), 72℃ 7min
*trn*L (Taberlet et al., 1991)	*trn*Lc: CGAAATCGGTAGACGCTACG *trn*Ld: GGGGATAGAGGGACTTGAAC	94 ℃ 2 min, 35 cycles (94℃ 1 min, 50-55℃ 1 min, 72℃ 2 min), 72℃

			8 min
*trn*L-*trn*F (Taberlet et al., 1991)	*trn*Le: GGTTCAAGTCCCTCTATCCC *trn*Lf: ATTTGAACTGGTGACACGAG		94 ℃ 2 min, 35 cycles (94℃ 1 min, 50-55℃ 1 min, 72℃ 2 min), 72℃ 8 min

2 结果与分析

2.1 DNA 条形码候选片段的序列特征分析

对海三棱藨草及其近缘种的 6 组 DNA 条形码候选序列的进行统计分析，结果表明（表 5），在各条形码中，*rbc*L 序列最长为 1 374 bp，*trn*L-*trn*F 序列最短为 597 bp；ITS 序列的 GC 含量最高，而 *trn*L 序列的 GC 含量最少。6 个 DNA 条形码片段的变异位点数依次排序为：ITS ＞ *ndh*F ＞ *mat*K ＞ *rbc*L ＞ *trn*L ＞ *trn*L-*trn*F。海三棱藨草及其近缘种的核基因 ITS 序列变异位点数远大于其他 5 个叶绿体基因片段的变异位点数。

表 5 DNA 片段长度、GC 含量和变异位点信息

Table 5 Sequence characteristics of 6 DNA barcodes

DNA 条形码 DNA barcoding	序列比对长度 Sequence length (bp)	GC 含量 GC %	SNPs 位点数 Number of SNPs	插入/缺失碱基数 Number of indels	变异位点 Number of variable sites	变异率 Percentage of variable sites %
ITS	706	61.1	32	3	35	4.96
*mat*K	1 188	27.8	4	0	4	0.34
*ndh*F	1 038	28.8	6	0	6	0.58
*rbc*L	1 374	41.7	2	0	2	0.15
*trn*L	597	25.8	1	0	1	0.17
*trn*L-*trn*F	444	27.7	0	0	0	0

2.2 DNA 条形码候选片段的种内、种间遗传变异

理想的 DNA 条形码序列种内变异水平应明显小于种间变异水平(宁淑萍等，2008)。本研究的种内种间 K2P 遗传距离结果显示（表 6），6 组 DNA 条形码候选序列的种内变异水平均为 0，除 ITS 序列之外，其余 5 组 DNA 条形码候选序列的种内种间变异均存在不同程度的重叠，各个条形码种间的变异大小依次排序为 ITS ＞ *ndh*F ＞ *mat*K ＞ *trn*L ＞ *rbc*L ＞ *trn*L-*trn*F。

表 6 六组 DNA 条形码候选序列的种内、种间遗传差异分析

Table 6 analysis of intraspecific and interspecific divergences of 6 DNA barcodes

DNA 条形码 DNA barcoding	种内变异 Intraspecific variation	种间变异 Interspecific variation
ITS	0	0.001 5±0.001 4 ~ 0.045 3 ± 0.008 3
*mat*K	0	0 ~ 0.003 5 ± 0.001 7
*ndh*F	0	0 ~ 0.005 9 ± 0.002 4
*rbc*L	0	0 ~ 0.001 5 ± 0.001 0
*trn*L	0	0 ~ 0.001 7 ± 0.001 7
*trn*L-*trn*F	0	0

2.3 DNA 条形码候选片段的鉴定效率评价

本研究采用 BLAST 法分析 6 组 DNA 条形码候选序列的鉴定成功率，结果显示（表 7），单一序列的鉴定效率均未能达到 100%，*mat*K 鉴定成功率最高为 52.4%，其次是 *ndh*F 和 *rbc*L 均为 28.6 %，ITS 的鉴定效率为 23.8%，*trn*L-*trn*F 和 *trn*L 片段的物种分辨率为 0。组合条形码中，ITS + *mat*K 的鉴定效率最高为 71.4%，其次是 *mat*K + *ndh*F 和 *mat*K + *rbc*L 的鉴定效率均达到 61.9%，而 ITS + *ndh*F、ITS + *rbc*L、ITS + (*trn*L-*trn*F)和 ITS + *trn*L 组合的鉴定效率分别为 52.4%、52.4%、23.8%和 23.8%。

表 7 六组 DNA 条形码候选序列的鉴定成功率

Table 7 Success rate of six barcode sequences

DNA 条形码 DNA barcoding	个体数 Number of samples	鉴定成功率 Success rate %
ITS	21	23.8
*mat*K	21	52.4
*ndh*F	21	28.6
*rbc*L	21	28.6
*trn*L-*trn*F	21	0
*trn*L	21	0
ITS + *mat*K	21	71.4
ITS + *ndh*F	21	52.4
ITS + *rbc*L	21	52.4
ITS + *trn*L-*trn*F	21	23.8
ITS + *trn*L	21	23.8
*mat*K + *ndh*F	21	61.9
*mat*K + *rbc*L	21	61.9

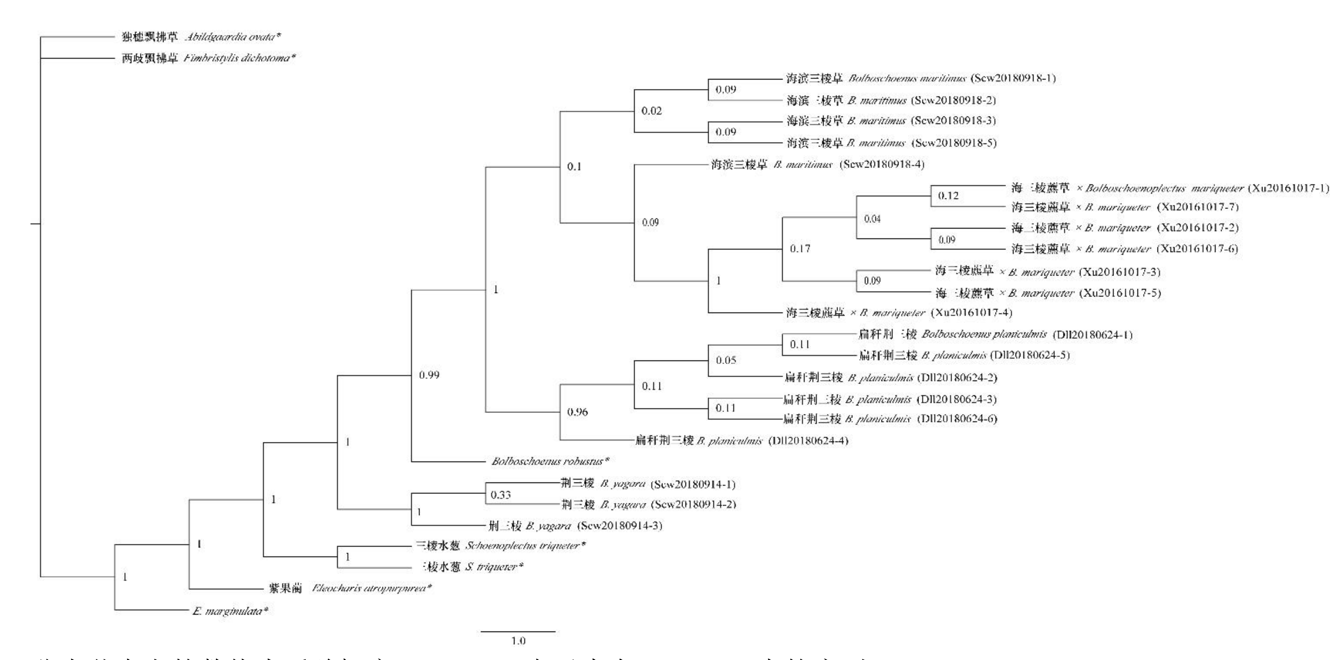
2.4 遗传聚类分析

为了探究海三棱藨草及其近缘种间的关系，本研究基于 ITS + *mat*K 序列构建了海三棱藨草及其近缘种的系统发育树，表 8 列举了从 GenBank 数据库中下载的外类群的 ITS 和 *mat*K 序列信息。为了评价核基因和叶绿体基因序列联合数据之间的一致性，本研究在 PAUP*4.0b10 上进行了不相和长度差异检验（Incongruence length difference test, ILD Test）(Dolphin et al., 2000)。*P* 值是用来衡量两组数据之间是否存在显著性差异（$P < 0.05$）。本研究中计算得出 *P* 值为 1.0，这表明核基因 ITS 和叶绿体基因 *mat*K 序列数据之间没有显著性差异，可以联合进行分析。本研究通过采用贝叶斯推断法（Bayesian inference, BI）来进行多基因联合构树，该方法更灵活，考虑更加全面，构树结果更可靠(Heled & Drummond, 2009)。ITS 和 *mat*K 序列联合矩阵总长度为 1 839 bp，变异位点数为 39。系统发育树结果表明（图 1），各分支聚集良好，大多表现为单系。外类群两个属的物种位于系统树基部，水葱属 [*Schoenoplectus* (Rchb.) Palla] 物种类群自成一支，与三棱草属物种类群 [*Bolboschoenus* (Asch.) Palla]明显分开，后验概率为 1。三棱草属物种类群由海三棱藨草及其近缘种组成，可以分为三个主支。最大一支包括了所有海三棱藨草(× *Bolboschoenoplectus mariqueter)*和海滨三棱草（*Bolboschoenus maritimus*）的样本。第二支包括了扁秆荆三棱（*B. planiculmis*）的 6 个样本，第三支则由荆三棱（*B. yagara*）的所有个体组成，均获得较高的支持率。在 ITS + *mat*K 序列构建的系统发育树中，海三棱藨草与海滨三棱草聚在一起，和扁秆荆三棱的所有样品聚成的一支构成姐妹支，另外，海滨三棱草的一个个体与海三棱藨草聚为一支，但自展值很低；荆三棱自成一支，与海三棱藨草的关系最远。

表 8 来自 GenBank 的外类群的序列信息

Table 8 Accession number of outgroup downloaded from GenBank

物种	基因片段和序列号 DNA region and GenBank accession number	
Species	ITS	*mat*K
Bolboschoenus robustus	KC677980	KX036983
三棱水葱 *Schoenoplectus triqueter*	AB206269	MK926068
三棱水葱 *S. triqueter*	KC677957	LC655263
紫果蔺 *Eleocharis atropurpurea*	GU110759	KX036926
E. marginulata	AY242056	KC123404
独穗飘拂草 *Abildgaardia ovata*	AB180719	KX036923
两歧飘拂草 *Fimbristylis dichotoma*	JX644882	KJ513620



分支节点上的数值为后验概率（PP）。*表示来自 GenBank 中的序列。

The numbers on the branch were posterior probabilities. * represent sequence from GenBank.

图 1 海三棱藨草及其近缘种基于 ITS + *mat*K 序列构建的 BI 树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on ITS + *mat*K sequences constructed using Bayes inference method of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and related species

3 讨论与结论

由于植物的进化历史复杂，目前尚未发现和动物 *CO Ⅰ* 基因一样，能够用作植物通用条形码的单一片段，因此从植物叶绿体基因组和核基因组中筛选出高效且通用的 DNA 条形码候选片段一直是困扰植物学家的重要难题(李德铢等，2015)。本研究应用 1 个核基因片段（ITS）与 5 个叶绿体基因片段（*mat*K、*ndh*F、*rbc*L、*trn*L 和 *trn*L-*trn*F）对海三棱藨草及其 3 个近缘种进行 DNA 条形码研究，评估 6 组候选 DNA 条形码序列及其组合片段的物种鉴定能力，同时探讨海三棱藨草与三个近缘种间的关系。

3.1 不同 DNA 条形码序列在海三棱藨草及其近缘种中的鉴定效率

被子植物的 ITS 序列具有侧翼高度保守、拷贝数多、协同进化快、易于扩增、测序和比对等特点(Baldwin et al., 1995)，被广泛应用于莎草科植物的系统发育研究中(Okihito et al., 2005; Shiels et al., 2014)。本研究基于通用引物 ITS4/ITS5 扩增得到的 ITS 序列包含了 ITS1 序列、5.8S rDNA 和 ITS2 序列三个部分，长度为 706bp。研究表明，该序列在水葱属和萤蔺属（*Schoenoplectiella* Lye）植物中的扩增长度为 636bp (Shiels et al., 2014)，在藨草属植

物中的扩增长度为 712bp (Jung & Choi, 2010)，另外该序列在藨草属植物中的变异率高达 47.3%，在水葱属和萤蔺属植物中的变异率为 32.4%，而在海三棱藨草及其近缘种中的变异率仅为 4.96%，推测可能是由于研究样本大小差异导致的。同时也表明了 ITS 序列在莎草科不同属中的序列长度和变异水平均有所差异。

*mat*K 基因是叶绿体基因组的蛋白编码区中进化速率最快的基因之一(Chase et al., 2007)，但其引物通用性还存在较多争议，不同分类群体之间往往需要更换多对引物进行扩增(Fazekas et al., 2008)。本研究共采用了两组通用引物进行 PCR 扩增，得到的 *mat*K 片段长度为 1 188bp，该结果与 Gilmour 等 (2013)的研究结果基本一致。本研究中，*mat*K 片段在海三棱藨草及其近缘种中的物种鉴定效率为 52.4%，而 Clerc-Blain 等 (2010)等人的研究表明 *mat*K 片段能够识别出加拿大北极群岛上 95%的薹草属（*Carex* L.）和嵩草属（*Kobresia* Willd.）植物，推测可能的原因是在上述研究区域内同属近缘种数目较少，实验过程中对近缘种采样不充分导致(Fazekas et al., 2008)。

*ndh*F 序列位于叶绿体基因的小单拷贝区（Small Single-copy Region, SSC），有研究表明，该序列 5′端较为保守而 3′端变异较大，进化速率是 *rbc*L 基因的两倍(Kim & Jansent, 1995)。本研究获得的 *ndh*F 序列长度为 1 038bp，与前人的研究结果基本相符，但该序列在海三棱藨草及其近缘种中的变异位点数远不及在水葱属和萤蔺属中(Gilmour et al., 2013)，物种的鉴定效率仅为 28.6%。

*rbc*L 序列相对保守，种间变异小，因其强大的通用性被广泛用于植物系统发育研究中。但 Starr 等 (2009)在使用引物 *rbc*L-a_f / *rbc*L-a_r 对薹草属植物的 *rbc*L 序列进行扩增和测序时，发现该序列获得率仅为 18%。本研究采用 1F/724R 对 *rbc*L 序列进行扩增，成功获得了 *rbc*L 片段，但序列变异率低（0.15%），远小于在韩国藨草属植物中的变异水平(Jung & Choi, 2010)，不能对海三棱藨草及其近缘种进行有效区分。

叶绿体 tRNA 基因 *trn*L（UAA）内含子具有催化功能，且存在二级结构(Kuhsel et al., 1990)，因此序列变异率较低；而 *trn*L-*trn*F 间隔区面临的选择压力小，进化速度快，适用于分类阶元较低的类群间的系统发育研究(Taberlet et al., 1991)。但本研究结果表明，这两条序列在海三棱藨草及其近缘种中非常保守，变异率和种间差异极小或为零，不适宜作为海三棱藨草及其近缘种鉴定的候选 DNA 条形码。

Starr 等 (2009)研究了 5 个 DNA 条形码片段（*mat*K, *rbc*L, *rpo*C1, *rpo*B, *trn*H-*psb*A）在薹草属下 *Deweyanae* 组、*Phyllostachyae* 组和 *Griseae* 组植物中的表现，结果表明，单一的 DNA 条形码片段的物种分辨率均不超过 60%。在本研究中，单一片段在海三棱藨草及其近缘种中的鉴定效率最高为 52.4%（*mat*K），仅有 11 个个体被成功鉴定。说明采用单一片段均无法对海三棱藨草及其近缘种进行有效区分。于是我们进一步分析了 DNA 条形码组合片段在海三棱藨草及其近缘种间的物种分辨率。叶绿体基因被认为作为一个整体（连锁）遗传，所以各区段的叶绿体序列可以直接进行联合分析。本研究发现，将两个叶绿体基因条形码序列进行组合后，物种的鉴定效率也相应的提升了。*mat*K + *rbc*L 和 *mat*K + *ndh*F 的片段组合的物种分辨率分别提升至 61.9%、61.9%。说明对 DNA 条形码进行联合分析能够提供更多有效信息位点，从而提高研究结果的准确性和可靠性(Fazekas et al., 2008)。被子植物的遗传背景复杂，叶绿体基因序列相对保守，进化缓慢，提供的信息位点数相对较少。研究表明核基因片段（ITS）可能与植物物种形成联系更加紧密，序列的分化速度更快(Wang et al., 2011)，研究者们建议将叶绿体基因片段与核基因组 DNA 条形码一起用于植物近缘种的分类学研究(刘建全, 2015)。本研究发现 ITS + *mat*K 序列组合的物种鉴定效率为所有组合片段中最高的（71.4%），基本上能实现对海三棱藨草及其近缘种的鉴别。综合考虑实验成本与收益、条形码通用性和物种鉴定能力等因素，我们建议将 ITS + *mat*K 序列组合作为海三棱藨草及其近缘种鉴定的最佳 DNA 条形码。

3.2 海三棱藨草的分类地位

海三棱藨草最初被认为是杂交起源(唐进和王发瓒，1965；Tatanov, 2007)；但从形态特征来看（表 2），其“具球茎；苞片 2 枚、叶状、直立或散生”的特征与水葱属植物不符，而且小坚果表面的网状纹饰也与水葱属小坚果的平滑型纹饰不符，应将其归入三棱草属(Dai et al., 2010)。本研究基于联合的 ITS + *mat*K 序列构建了海三棱藨草及其近缘种的系统发育树，结果表明海三棱藨草与三棱草属的其他 3 个物种形成一支，明显与水葱属分开，支持率为 100%，因此本研究结果不支持将海三棱藨草作为水葱属和三棱草属的属间杂交种，支持将其归入三棱草属，这也与杨梅 (2010)基于 ITS 序列对海三棱藨草的进行系统发育研究的结论相符合。另外，系统发育树结果还显示：海三棱藨草与海滨三棱草形成单系，一方面为海三棱藨草和海滨三棱草是同一个物种提供了分子证据，另一方面，本研究中海滨三棱草只有一个样品不与同种其它样品最近而与海三棱藨草最近，且后验概率仅为 0.09，这意味着该节点可能不存在，但不排除两个种互为单系的可能，即从分子证据上来说海三棱藨草与海滨三棱草也可能是三棱草属的两个物种。结合形态学研究和二者的生境、分布区分析可以发现（表 2、3），海三棱藨草与海滨三棱草在形态上几乎一致，唯有在小穗鳞片长度和下位刚毛长度上存在细微差异；二者生境一致，均为沿海沼泽或内陆湖滨及河岸；二者分布区的区系成分基本一致(吴征镒等，2010)，但具体分布点差异较大（表 3），尤其是未见海三棱藨草国外分布的报道，这应该是海三棱藨草和海滨三棱草两种名长期混淆导致的。综上，本研究结果不支持海三棱藨草源自三棱水葱和扁秆荆三棱种间杂交的说法(Yang et al., 2009)，而应将其纳入到三棱草属中；不支持 Koyama (1980)提出的海三棱藨草为扁杆荆三棱的异名的观点，支持海三棱藨草为海滨三棱草异名的推论(宋晨薇等，2019)。

综上所述，本研究通过海三棱藨草及其近缘种的 DNA 条形码研究，一方面筛选并明确了 ITS + *mat*K 组合序列为海三棱藨草及其近缘种分辨率最高的 DNA 条形码片段组合，另一方面通过将分子、形态和植物地理学证据相结合，明确了应将海三棱藨草纳入到三棱草属中，其应为海滨三棱草的异名，为今后海三棱藨草及其近缘种的分类学研究奠定了理论基础。本研究仅选用了 6 组 DNA 条形码候选序列进行研究，有关三棱草属植物的 DNA 条形码研究有待进一步展开。

参考文献

BALDWIN BG, SANDERSON MJ, PORTER JM, et al., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny[J]. Ann Mo Bot Gard, 82(2): 247-277.

CHASE MW, COWAN RS, HOLLINGSWORTH PM, et al., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon, 56(2): 295-299.

CHEN XZ, SUN Y, 2011. Chinese endemic salt marsh plant—Bulrush (*Scirpus mariqueter*), current status of its conservation and utilization[J]. Wetland Sci & Manage, 7(1): 60-63. [陈秀芝，孙瑛，2011. 中国特有盐沼植物——海三棱藨草的现状及保护利用[J]. 湿地科学与管理，7(1)：60-63.]

CLERC-BLAIN JL, STARR JR, BULL RD, et al., 2010. A regional approach to plant DNA barcoding provides high species resolution of sedges (*Carex* and *Kobresia*, Cyperaceae) in the Canadian Arctic Archipelago[J]. Mol Ecol Resourc, 10(1): 69-91.

COSTION C, FORD A, CROSS H, et al., 2011. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras[J]. PLoS ONE, 6(11): e26841.

DAI L, LIANG S, ZHANG S, et al., 2010. Cyperaceae[M]// Wu Z, Raven PH eds. Flora of China. Beijing: Science Press: 179-181.

DOLPHIN K, BELSHAW R, ORME CDL, et al., 2000. Noise and incongruence: interpreting results of the Incongruence Length Difference Test[J]. Mol Phylogen Evol, 17(3): 401-406.

FAZEKAS AJ, BURGESS KS, KESANAKURTI PR, et al., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well[J]. PLoS ONE, 3(7): e2802.

GILMOUR CN, STARR JR, NACZI RFC, 2013. *Calliscirpus*, a newgenus for two narrow endemics of the California Floristic Province, *C. criniger* and *C. brachythrix* sp. nov. (Cyperaceae)[J]. Kew Bull, 68: 85-105.

GLON HE, SHIELS DR, LINTON E, et al., 2017. A five gene phylogenetic study of Fuireneae (Cyperaceae) with a revision of *Isolepis humillima*[J]. Syst Bot, 42(1): 29-36.

HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, et al., 2003. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B, 270(1512): 313-321.

HEBERT PDN, RATNASINGHAM S, DEWAARD JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B, 270(Supply 1): S96-S99.

HELED J, DRUMMOND AJ, 2009. Bayesian inference of species trees from multilocus data [J]. Mol Biol Evol, 27(3): 570-580.

HROUDOVá Z, ZáKRAVSKý P, DUCHáČEK M, et al., 2007. Taxonomy, distribution and ecology of *Bolboschoenus* in Europe[J]. Ann Bot Fenn, 44(2): 81-102.

HROUDOVÁ Z, ZÁKRAVSKÝ P, WÓJCICKI JJ, et al., 2005. The genus *Bolboschoenus* palla (Cypereceae) in Poland[J]. Polish Bot J, 50(2): 117-137.

HU JL, CI XQ, LIU ZF, et al., 2022. Assessing candidate DNA barcodes for Chinese and internationally traded timber species[J]. Mol Ecol Resour, 22: 1478-1492.

JUNG J, CHOI H-K, 2010. Systematic rearrangement of Korean *Scirpus L. s.l.* (Cyperaceae) as inferred from nuclear ITS and chloroplast *rbc*L sequences[J]. J Plant Biol, 53: 222-232.

KIM K-J, JANSENT RK, 1995. *ndh*F sequence evolution and the major classes in the sunflower

family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 92(22): 10379-10383.
KOYAMA T, 1980. The genus *Bolbosahoenus* Palla in Japan[J]. Acta Phytotaxon Geobot, 31(4-6): 139-148.
KUHSEL MG, STRICKLAND R, PALMER JD, 1990. An ancient group I Iintron shared by eubacteria and chloroplasts[J]. Science, 250(4987): 1570-1573.
LÉVEILLÉ-BOURRETÉ, CHEN BH, GARON-LABRECQUE M-È, et al., 2020. RAD sequencing resolves the phylogeny, taxonomy and biogeography of Trichophoreae despite a recent rapid radiation (Cyperaceae)[J]. Mol Phylogen Evol, 145: 106727.
LI DZ, ZENG CX, 2015. Prospects for plant DNA barcoding[J]. Biodivers Sci, 23(3): 297-298. [李德铢，曾春霞，2015. 植物 DNA 条形码研究展望[J]. 生物多样性，23(3)：297-298.]
LI X, YANG Y, HENRY RJ, et al., 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome[J]. Biological Reviews, 90(1): 157-166.
LIANG SC, 2022. List of wetland vascular plants in China[M]. Beijing: Science Press: 168-169. [梁士楚，2022. 中国湿地维管植物名录[M]. 北京：科学出版社：168-169.]
LIANG SY, TUCKER GC, KOYAMA T, 2010. Cyperaceae[M]// WU Z, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press: 181-188.
LIU J, YAN HF, NEWMASTER SG, et al., 2015. The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China[J]. Divers Distrib, 21: 188-199.
LIU JQ, 2015. DNA barcodes, speciation and taxonomy in plants[J]. Biodivers Sci, 23(3): 283-285. [刘建全，2015. 植物 DNA 条形码、物种形成和分类学[J]. 生物多样性，23(3)：283-285.]
NING SP, YAN HF, HAO G, et al., 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants[J]. Biodivers Sci, 16(5): 417-425. [宁淑萍，颜海飞，郝刚，等，2008. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性，16(5)：417-425.]
OKIHITO Y, TAKUJI. H, 2005. Molecular phylogeny and chromosomal evolution of Japanese *Schoenoplectus* (Cyperaceae), based on ITS and ETS 1f sequences[J]. Acta Phytotaxon Geobot, 56: 177-189.
OLMSTEAD RG, MICHAELS HJ, SCOTT KM, et al., 1992. Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbc*L[J]. Ann Mo Bot Gard, 79(2): 249-265.
PÍŠOVÁ S, HROUDVÁ Z, CHUMOVÁ Z, et al., 2017. Ecological hybrid speciation in central-European species of *Bolboschoenus*: genetic and morphological evaluation[J]. Preslia, 89: 17-39.
SHIELS DR, HURLBUT DL, LICHTENWALD SK, et al., 2014. Monophyly and phylogeny of *Schoenoplectus* and *Schoenoplectiella* (Cyperaceae): evidence from chloroplast and nuclear DNA sequences[J]. Syst Bot, 39(1): 132-144.
SHINOZAKI K, SUGIURA M, 1982. The nucleotide sequence of the tobacco chloroplast gene for the large subunit of ribulose-l, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase[J]. Gene, 20: 91-102.
SONG CW, TANG Q, ZhAO ZP, et al., 2019. Nutlet shape and pericarp micromorphology of × *Bolboschoenoplectus mariqueter* and related species[J]. Plant Sci J, 37(3): 290-294. [宋晨薇，唐琼，赵志鹏，等，2019. 海三棱藨草及其近缘种果实形状和果皮微形态特征研究[J]. 植物科学学报，37(3)：290-294.]
STARR JR, NACZI RFC, CHOUINARD BN, 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (Carex, Cyperaceae)[J]. Mol Ecol Resour, 9(Supply 1): 151-163.

TABERLET P, GIELLY L, PAUTOU G, et al., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA[J]. Plant Mol Biol, 17: 1105-1109.

TANG J, WANG FZ. 1965. Flora of China: Vol. 23[M]. Beijing: Science Press: 72-108. [唐进，王发瓒，1965. 中国植物志：第 11 卷[M]. 北京：科学出版社：72-108.]

TATANOV I, 2007. Hybrida intergenricua nouvus ×*Bolboschoenoplectus* Tatanov(Cypereceae)[J]. Novit SystemPlant Vascul, 39: 154.

VANE-WRIGHT RI, HUMPHRIES CJ, WILLIAMS PH, 1991. What to protect? systematics and the agony of choice[J]. Biol Conserv, 55(3): 235-254.

WANG Q, YU QS, LIU JQ, 2011. Are nuclear loci ideal for barcoding plants? A case study of genetic delimitation of two sister species using multiple loci and multiple intraspecific individuals[J]. J Syst Evol, 49(3): 182-188.

WARD E, ADAMS MJ, 1998. Analysis of ribosomal DNA sequences of Polymyxa species and related fungi and the development of genus- and species- specific PCR primer[J]. Mycol Res, 102(8): 965-974.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. San Diego: Academic Press: 315-322.

WU ZY, SUN H, ZHOU ZK, et al., 2010. Floristics of seed plants from China[M]. Beijing: Science Press: 52-83. [吴征镒，孙航，周浙昆，等，2010. 中国种子植物区系地理[M]. 北京：科学出版社：52-83.]

YANG M, 2010. The study on species′ biology of *Scirpus* × *mariqueter* and its genetic structure in China[D]. Shanghai: Fudan University: 26-37. [杨梅，2010. 海三棱藨草的物种生物学和遗传结构研究[D]. 上海：复旦大学：26-37.]

YANG M, LV X, FAN W, et al., 2013. Interspecific hybridization between *Scirpus mariqueter* Ts. Tang & F.T. Wang and *S. planiculmis* F. Schmidt and their selfing[J]. Aquat Bot, 110: 92-96.

YANG M, ZHOU Y, ZHU Q, et al., 2009. AFLP markers in the detection of *Scirpus* × *mariqueter* (Cyperaceae) hybrid in China[J]. Aquat Bot, 91: 298-302.

YEN AC, OLMSTEAD RG, 2000. Molecular systematics of cyperaceae tribe Cariceae based on two chloroplast DNA regions: *ndhF* and *trnL* intron-intergenic spacer[J]. Syst Bot, 25 (3): 479-494.

ZHOU Y, WANG H, YANG M, et al., 2009. Development of microsatellites for *Scirpus mariqueter* Wang et Tang (Cyperaceae) and cross-species amplification in *Scirpus planiculmis* F. Schmidt[J]. Mol Ecol Resour, 9(1): 370-372.

ZHU J, JING K, GAN XJ, et al., 2007. Food supply in intertidal area for shorebirds during stopover at Chongming Dongtan, China[J]. Acta Ecol Sin, 27(6): 2149-2159. [朱晶，敬凯，干晓静，等，2007. 迁徙停歇期鸻鹬类在崇明东滩潮间带的食物分布[J]. 生态学报，27(6)：2149-2159.]